

# 台灣牛羊呼吸道病例分離菌種之抗原性、毒力因子、菌株親緣性及抗藥性分析

官南綾\*、涂堅

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

**摘要** 草食動物呼吸道疾病的病原中，細菌雖常為伺機性感染，但其引發的嚴重症狀所導致的經濟損失不容忽視。在台灣草食動物呼吸道細菌性疾病的研究與調查不多，細菌的影響可能被低估。本研究年12月至2017年12月期間共收集61例(8隻牛和53隻羊)呼吸道病例進行菌種的抗原性、毒力因子、菌株親緣性及藥物感受試驗檢測，結果所分離到之98株細菌中，最常見前四名依序為*Pasteurella multocida* 37株，*Mannheimia haemolytica* 18株，*Moraxella* sp. 10株及*Bibersteinia trehalosi* 5株；其中*Pasteurella multocida*之主要莢膜型為D型，其次為莢膜型A型。而MLST結果有1株屬於ST79，以及另外5種新的ST型。而*Mannheimia haemolytica*之MLST結果共有9型，包含ST1、ST2、ST16、ST21、ST28型以及4種新ST型。本次分離之*Pasteurella multocida*、*Pasteurella trehalosi*、*Moraxella* sp.及*Mannheimia haemolytica*對於amoxicillin/clavulanic acid、ceftiofur、florfenicol及enrofloxacin等藥物大多數具感受性，尚未有抗藥性菌株產生。

**關鍵詞：**多殺性巴斯德桿菌、溶血性曼哈米亞桿菌、多基因位點序列分型、抗藥性

## 緒言

草食動物呼吸道疾病的病因大多是複合性，病原主為病毒和細菌，在動物遭遇運輸、併欄或是寒冷感作等緊迫因子的刺激下，趁機感染、發作引起疾病。其中細菌性病原常為伺機性感染，Francoz等人的研究指出，乳牛呼吸道疾病(bovine respiratory disease, BRD)病例中，分離率排名第一的菌種是*Pasteurella multocida*，其次為*Mannheimia haemolytica*(舊名*Pasteurella haemolytica*) [6]，這兩種細菌在動物的鼻腔即可分離到[15]。感染後臨床上常見的症狀為纖維素性、化膿性為主的肺炎或支氣管肺炎。

*Pasteurella multocida*依據莢膜抗原的差異，分為A、B、D、E、F五種血清型，可能具有宿主特異性，不同的動物別有其好發的莢膜血清型，且可能引發不同的臨床症狀[3]。豬以A型和D型為主，兩者皆可能

造成肺炎及萎縮性鼻炎。而牛則好發A型和B型，但A型多為肺炎(運輸熱, shipping fever)，較少出現乳房炎的臨床症狀，B型則多引發出血型敗血症[3]。然而不同國家及年代的研究仍有所差異，在英格蘭(England)及威爾斯(Wales)來自不同物種的*Pasteurella multocida*，最主要的型別都是A型[4]。若根據菌體之體抗原(somatic antigen)來區分，*Mannheimia haemolytica*感染後動物造成的病變與*Pasteurella multocida*類似，分為1、2及6三種血清型，其中1型與6型被認為是與BRD最有關聯的型別[9]。

鑒於家畜衛生試驗所細菌室業務中有四至五成是草食動物病例，其中約有三成至四成送檢病史中有呼吸道症狀或病變，且台灣近年對於相關細菌的文獻較少，因此本研究針對2009年12月至2017年12月期間的草食動物呼吸道病例分離之病原菌進行回顧性

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

研究，並對部分病原菌如 *Pasteurella multocida* 及 *Mannheimia haemolytica* 檢測其抗原性、毒力因子、菌株親緣性及進行藥物感受試驗，期望能提供地方疾病防治單位參考。

## 材料與方法

自2009年12月至2017年12月間，由臨床上呈現呼吸促迫、口鼻分泌物及消瘦等呼吸道症狀，而剖檢肺臟具有肉眼病變(常見不等程度之化膿灶)之病例共61例，包括牛隻8例和羊隻53例。

### 細菌分離與鑑定

由鼻腔拭子和/或肺臟病變，以一般培養基(血液培養基、巧克力培養基)，搭配選擇性培養基(MacConkey agar)進行細菌分離。細菌純化後，經由革蘭氏染色法確認陽性菌或陰性菌，配合GN、GP及CBC等相對應之鑑定套組，以全自動微生物分析系統 Vitek 2 Compact (bioMérieux) 進行生化鑑定。

### 莢膜型別及血清型別檢測

經鑑定為 *Pasteurella multocida* 之菌株後續會進行莢膜型別檢測，參考 Townsend 等人的研究[16]，以其中所列之引子及反應條件，以莢膜酶連鎖反應(capsular PCR typing) 確認 *Pasteurella multocida* 之莢膜型別。經鑑定為 *Mannheimia haemolytica* 之菌株則參考 Kumar 等人的研究[11]，以其中所列之引子及反應條件，以PCR檢測該細菌是否為與毒力有關的第1血清型。

### 菌株親源性

參考 <http://pubmlst.org> (University of Oxford 開發) 以多基因位點序列分型 (multilocus sequence typing, MLST)[8]，針對7個 *Pasteurella multocida* 的 house keeping genes (*adk*、*est*、*pmi*、*zwf*、*mdh*、*gdh* 及 *pgi*)，及 *Mannheimia haemolytica* 的 house keeping genes (*adk*、*aroE*、*deoD*、*gapDH*、*gdh*、*mdh* 及 *zwf*)，使用該資料庫設計之引子及反應條件增幅、定序，可用來區別不同來源的菌株；7個基因序列和資料庫 (<http://pubmlst.org>) 比對後可得到相對應的 ST(sequence type) 型。前述的結果可用 geoBURST

(<http://www.phyloviz.net>) 演算軟體，以擬陣圖型(以點和線組成之樹狀圖) 呈現不同ST型的親緣性。

### 藥物感受性試驗

以抗菌劑紙錠瓊脂擴散法 (disk agar diffusion method) 依照 The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 標準檢測 amoxicillin/clavulanic acid、ceftiofur、kanamycin、enrofloxacin、florfenicol、tetracycline 等抗菌劑。以 Sensititre Vizion System® (Thermo Scientific)，選擇 *Pasteurella multocida* 及 *Mannheimia haemolytica* 專用套組 BOPO6F，參考 El Garch 等人的研究[5]，選擇 ampicillin、ceftiofur、danofloxacin、enrofloxacin、florfenicol、gentamicin、neomycin、oxytetracyclin、tulathromycin、tiamulin、tilmicosin、tylosin、trimethoprim/sulphamethoxazole 及 spectinomycin 等 14種抗菌劑，測試最小抑制濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。

## 結果

### 細菌分離與鑑定

如表1，由61例(牛8隻和羊53隻)鼻腔拭子和/或肺臟病變進行細菌分離結果，有57.4% (35/61) 的病例僅分離到一種菌，其最常見者為 *Pasteurella multocida*，*Trueperella pyogenes* (舊名 *Arcanobacterium pyogenes*) 次之；有34.4% (21/61) 為二種菌混合感染，其以 *Pasteurella multocida* 及 *Mannheimia haemolytica* 之組合最為常見；混合感染三種以上細菌之病例佔8.2% (5/61)，其中有一例分離到四種菌。以動物別來看，8例牛隻病例皆只分離到一種菌，53例羊隻病例中有50.9% (27/53) 僅分離到一種菌，其餘病例至少為兩種以上細菌混合感染。

如表2，在61例草食動物呼吸道感染病例中共分離出98株細菌，其中屬於呼吸道菌種者共82株，前四名依序為 *Pasteurella multocida* 37株，*Mannheimia haemolytica* 18株，*Moraxella* sp. 10株及 *Bibersteinia trehalosi* (舊名 *Pasteurella trehalosi*) 5株；屬於化膿性細菌者共16株，包括 *Trueperella*

*pyogenes* 12 株 及 *Corynebacterium pseudotuberculosis* 4株。以動物別來看，8例牛隻病例共分離到8株菌，分離最多的是 *Trueperella pyogenes* 4株，*Pasteurella multocida* 2株，*Corynebacterium pseudotuberculosis* 及 *Streptococcus* sp.各1株。53例羊隻病例共分離到90株菌，其中因為 *Mannheimia haemolytica*、*Moraxella* sp.及 *Bibersteinia trehalosi* 只有在羊隻病例分離到，故扣除牛隻分離之菌株後，呼吸道菌種之分離數量排名順序不變，最常見的分離菌種依序仍是 *Pasteurella multocida* 38.8% ( 35/90 )，*Mannheimia haemolytica* 20% ( 18/90 )，*Moraxella* sp. 11.1% ( 10/90 ) 及 *Bibersteinia trehalosi* 5.6% ( 5/90 )。

### 荚膜型別及血清型別檢測

37株 *Pasteurella multocida* 的荚膜型別檢測結果，有37.8% (14/37) 為A型，62.2% (23/37) 為D型；其中分離自牛隻病例的2株 *Pasteurella multocida* 皆為A型。18株 *Mannheimia haemolytica* 的血清型別檢測結果，有33.3% (6/18) 為毒力強之第1血清型，剩餘者血清型別不明。

### 菌株親源性

*Pasteurella multocida* 及 *Mannheimia haemolytica* 菌株進行MLST分析，個別基因定序結果與基因資料庫 (<http://pubmlst.org/>) 比對結果表3和表4。在 *Pasteurella multocida* 的部分，除了1株是ST 79型外，其餘36株皆無法在資料庫對應到完全相同的ST型別，故皆為新型別 (new ST)，暫訂為ST-A、ST-B、ST-C、ST-D及ST-E (表3)；其中僅2種型別 (ST-B及ST-C) 只有一個基因的差異 (single-locus variant, SLV)，其它最接近的型別至少有2個基因以上的差異。但整體而言，仍有主要流行的ST型，其最主要的ST-A型佔 67.6% (25/37)，其次為ST-B及ST-C型佔 24.3% (9/37)，剩餘型別各僅1株。geoBURST的分析結果，淺綠色的點 (light green) 代表群 (group)，深綠色的點 (dark green) 代表次群 (sub-group)，淺藍色的點 (light blue) 代表與群有關連而衍生出的節 (common node)，點上標示之ST

字型越大表示菌株數越多；點與點之間以黑色實線連結，表示兩點所代表的ST型有一個基因的差異 (SLV)，若以灰色的線連結表示兩點間差異越大 (至少兩個基因差異；double-locus variant(s), DVL(s))，顏色越淺差異越大。圖1是 *Pasteurella multocida* 6種ST型的親緣性，整體分成三群，其中ST-A、ST-B、ST-C及ST-D相近同屬一群，為最大群組。

在 *Mannheimia haemolytica* 的部分，現有ST 1、ST 2、ST 16、ST 21及ST 28型及4種在資料庫無對應ST型別之結果，這4種菌株MLST分析結果相差甚遠，且其中1株之aroE與資料庫比對無相符序列 (表四)：其主要型別分別為ST 2及ST 28，各佔約三成。其geoBURST的分析結果 (圖2) 可見彼此歧異度大，分為5群，ST 1、ST 2、ST 16、ST 28及ST-A雖然同但彼此間最大差異可達三個基因以上 (Triple-locus variant(s), TVL(s))。

### 藥物感受性試驗

如表5，紙錠瓊脂擴散法參考CLSI (2013)年 *Pasteurella multocida* 之判讀標準，做為臨床上分離之 *Pasteurella multocida*、*Mannheimia haemolytica*、*Bibersteinia trehalosi* 及 *Moraxella* sp. 菌株，對於 amoxicillin/clavulanic acid、ceftiofur、florfenicol、enrofloxacin 及 kanamycin 等進行測試。所有 *Moraxella* sp. 對於前5種抗菌劑皆具感受性。*Pasteurella multocida* 則對於 amoxicillin/clavulanic acid、ceftiofur、florfenicol 及 enrofloxacin 皆具感受性，僅1株對於 kanamycin 產生抗藥性且源自牛隻病例。*Mannheimia haemolytica* 亦有類似結果。在 *Pasteurella trehalosi* 的部分，對於 amoxicillin/clavulanic acid、ceftiofur、florfenicol 皆具感受性，僅1株對於 enrofloxacin 和 kanamycin 具抗藥性。

並非所有分離到之菌株皆進行MIC分析，僅針對菌株數量所佔比例較多且測試的抗菌物質有CLSI標準或前人研究參考[5]者之 *Pasteurella multocida* 及 *Mannheimia haemolytica* 進行MIC值檢測。37株 *Pasteurella multocida* MIC檢測結果如表6，有100% *Pasteurella multocida* 對於 ceftiofur、danofloxacin、enrofloxacin、florfenicol 及 tulathromycin 具感受性。部

分抗菌劑受限於專用套組BOPO6F設計，其檢測濃度範圍小，例如trimethoprim/sulphamethoxazole之濃度只檢測2 µg/mL，為CLSI之判讀臨界點(break point)，故100% *Pasteurella multocida* 的 trimethoprim/sulphamethoxazole 之 MIC 為 2 µg/mL。43.2% *Pasteurella multocida*的oxytetracycline之MIC超過4 µg/mL，具有抗藥性。CLSI之spectinomycin判讀臨界點為超過64 µg/mL（即產生抗藥性），16株 *Pasteurella multocida*的spectinomycin之MIC為64 µg/mL，屬於 intermediate（中間性）；其餘21株 *Pasteurella multocida*的spectinomycin之MIC為32 µg/mL，意即仍有近六成具感受性。18株 *Mannheimia haemolytica* MIC 檢測結果如表7，其MIC類似 *Pasteurella multocida*，對於大多數藥物皆具感受性，僅各1株對oxytetracycline及enrofloxacin產生抗藥性，其MIC分別為8 µg/mL及2 µg/mL。而對於spectinomycin，17株 *Mannheimia haemolytica*的spectinomycin之MIC為64 µg/mL，屬於中間性；1株 *Mannheimia haemolytica*的spectinomycin之MIC為32 µg/mL，具感受性。

## 討論

本研究分離最多的病原菌是 *Pasteurella multocida* 37.8% (37/98)，其次是 *Mannheimia haemolytica* 18.4% (18/98)，及排名第三的化膿菌 *Trueperella pyogenes* 12.2% (12/98)。與家畜衛生試驗所另一篇調查結果不盡相同，在2006年4月至2008年5月期間，自26個有肺炎症狀的牛羊病例中，分離得16株病原菌，其中分離率前三名依序是 *Trueperella pyogenes* 43.7% (7/16)，*Streptococcus bovis* 25% (4/16) 及 *Pasteurella multocida* 18.7% (3/16)，並僅分離得 *Mannheimia haemolytica* 6.2% (1/16) [2]。另一篇草食動物傳染性疾病監控計畫中，針對牛流行熱、牛傳染性鼻氣管炎、巴斯德桿菌症及黴漿肺炎 (*Mycoplasma bovis*) 等呼吸道疾病進行血清IgM-ELISA檢測，結果發現，以黴漿肺炎感染率最高，其次為巴斯德桿菌症及牛流行熱，並且有兩種甚至三種病原混合感染的情形[1]。

前人的調查及本次研究結果顯示在牛羊呼吸道疾病中，細菌病原中 *Pasteurella multocida* 具有重要的影響，並常見與其他細菌如黴漿菌及 *Trueperella pyogenes* 等混合感染的情況。在國外針對BRD的文獻中，*Pasteurella multocida*、*Mannheimia haemolytica*、*Mycoplasma bovis* 及 *Trueperella pyogenes* 都是常見的病原菌，Francoz等人的研究中57%牛隻可分離得 *Pasteurella multocida*，其次是佔18%的 *Mannheimia haemolytica* [6]。部分文獻將 *Mannheimia haemolytica* 視為BRD中最重要細菌病原，如Klimar等人的研究則是91%的BRD檢體可用PCR檢測到 *Mannheimia haemolytica* 的核酸 [10]，Noyes 等人在29% (1,596/5,498) 牛隻的鼻咽拭子 (nasopharyngeal swab) 分離得 *Mannheimia haemolytica* [13]。本研究中 *Mannheimia haemolytica* 的分離率僅次於 *Pasteurella multocida*，且兩者是最常見的混合感染細菌，可能會加劇感染動物的症狀及影響治療效果。

本研究中分離之 *Pasteurella multocida* 菌株主要為莢膜型D型，其次為莢膜型A型，兩種型別在草食動物都屬常見，雖然其他文獻在自不同物種肺炎分離之菌株多為A型 [3,4]。以MLST進行基因分型的結果，*Pasteurella multocida* 與資料庫比對，其結果包含1株屬於ST79及5種新ST型，67.6%屬於ST-A型，24.3%屬於ST-B型，為現場主要流行2種型別，其中ST79型已知為BRD牛隻中常見的型別，在英國、美國及西班牙都有分離此型別的相關研究 [8, 17]，本研究中1株份離自牛隻病例的 *Pasteurella multocida* 為ST79型外，其他皆為新ST型，顯示台灣牛羊群中可能有在地化的流行菌株。*Mannheimia haemolytica* 之菌株數雖較 *Pasteurella multocida* 少，但ST共有9型，包含ST1、ST2、ST16、ST21及ST28型及4種新ST型，其菌株間歧異度較複雜，其中ST16型及ST28型為小反芻獸肺炎病例常見的型別，這些型別在肺部有病變及無病變的檢體都可能分離到，彼此可能不存在致病力的差異 [7]。

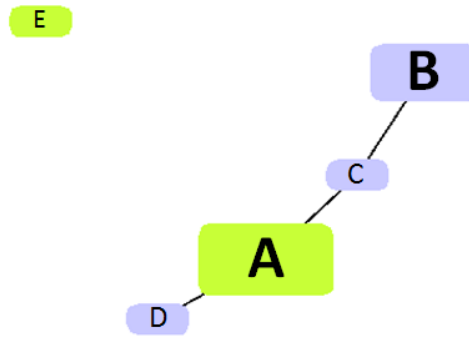
細菌性疾病的治療上無法避免使用抗菌劑，本次分離得之 *Pasteurella multocida*、*Bibersteinia trehalosi*、*Moraxella* sp. 及 *Mannheimia haemolytica*，

紙錠瓊脂擴散法的結果顯示對於多數抗菌物質如 amoxicillin/clavulanic acid、ceftiofur、florfenicol 及 enrofloxacin 皆具感受性，尚未產生抗藥性菌株。本研究中另外就分離菌株數較多的 *Pasteurella multocida* 及 *Mannheimia haemolytica* 進行最小抑制濃度試驗，其中 *Pasteurella multocida* 的部分，所有菌株對於 ceftiofur、danofloxacin、enrofloxacin、florfenicol 及 tulathromycin 皆具感受性，其結果與歐洲的調查近似，對於前述5種抗藥物質幾乎無抗藥性[5]。美國及加拿大的為期10年（2000-2009）計畫的結果略有不同，該研究顯示100% *Pasteurella multocida* 對於 ceftiofur 及 danofloxacin 具感受性，近九成的菌株對於 enrofloxacin 及 tulathromycin 具感受性，對於 florfenicol 則是有八成以上菌株具感受性[14]。本研究在 *Mannheimia haemolytica* 部分的類似 *Pasteurella multocida*，僅各1株對 oxytetracycline 及 enrofloxacin 產生抗藥性，與 Noyes 等人結果相似[13]；在 spectinomycin 的部分，相較於該篇的結果僅4.5%之菌株產生抗藥性，本研究分離之 *Mannheimia haemolytica* 雖尚未對 spectinomycin 產生抗藥性，但值得注意的是九成以上的菌株之MIC落在中間性（即介於感受性及抗藥性的判讀區間）。Noyes 等人的研究同時指出一個有趣的現象：出自牛隻肺部分離得 *Mannheimia haemolytica* 其抗藥性結果與該牛隻生前所接受過的抗菌劑治療計畫無關，推測抗菌劑的使用並非唯一影響抗藥性產生之機制[13]。

臨床菌株的藥物感受性試驗除了提供治療的方針，也具有監控的意義。在美國及加拿大的為期10年

（2000-2009）計畫中，研究 *Pasteurella multocida* 菌株對於 ceftiofur、penicillin、enrofloxacin、florfenicol、tetracycline、tilmicosin 及 tulathromycin 等抗菌劑的最小抑制濃度 MIC<sub>50</sub>（可以抑制一半的菌數生長）及 MIC<sub>90</sub>（可以抑制90%的菌數生長），其中 tilmicosin 及 tulathromycin 的 MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 結果在2007年明顯上升，可視為抗藥性改變的警訊[14]。或許是不同國家的法規及用藥習慣上的差異，伊朗的研究報告則相反，*Pasteurella multocida* 菌株對於 ceftiofur 及 florfenicol 有抗藥性[9]。在美國針對389株 *Mannheimia haemolytica* 對於 ceftiofur、danofloxacin、enrofloxacin、florfenicol、oxytetracycline、spectinomycin、tilmicosin 及 tulathromycin 藥性的研究，結果也呈現抗藥性逐年上升的趨勢：在2009年35%對於前述抗菌劑都具感受性，僅5%對與5種抗菌劑有抗藥性；但到了2011年，剩下15%菌株尚未產生抗藥性，而對與5種抗菌劑有抗藥性者上升至35%[12]。本研究因為菌株數量少無法分年度分析 MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 來呈現抗藥性的變化。

整體而言，37株 *Pasteurella multocida* 及18株 *Mannheimia haemolytica* 對 ampicillin、ceftiofur、danofloxacin、enrofloxacin、florfenicol、gentamicin、neomycin、oxytetracycline、tulathromycin、tiamulin、tilmicosin、tylosin、trimethoprim/sulphamethoxazole 及 spectinomycin 等14種抗菌劑多數不具抗藥性，即所謂泛敏感性（pan-susceptible），顯示現場在使用抗菌劑治療細菌性肺炎方面仍有較多元的選擇。



79

圖 1、*Pasteurella multocida* 之 6 種 ST 型以 geoBURST 分析親緣性，整體分 3 群（以淺綠點表示），淺藍色的點（light blue）代表與群有關連而衍生出的節（common node）。其中 ST-A 群最大，且此群中每個節點以黑色實線連結（single-locus variant, SLV），ST-A 及 ST-B 為主要流行型別。

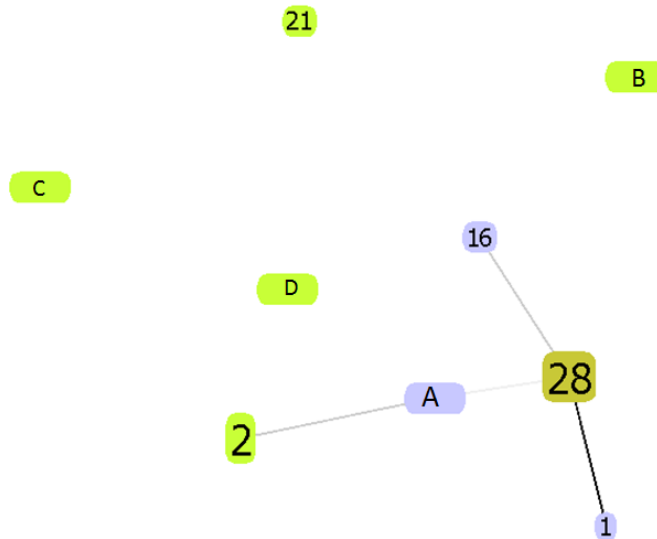


圖 2、*Mannheimia haemolytica* 之 9 種 ST 型以 geoBURST 分析親緣性，整體分 5 群（以淺綠點表示），淺藍色的點（light blue）代表與群有關連而衍生出的節（common node）。其中 ST2 群內有一次群（以深綠點表示）ST28。ST28 與 ST1 之間為 SLV。ST28 與 ST16 之間、ST2 與 ST-A 之間為 DVL(s)（double-locus variant(s)）。ST28 與 ST-A 之間為 TVL(s)（triple-locus variant(s)），顯示此群間彼此歧異度大。ST28 及 ST2 為主要流行型別。

台灣牛羊呼吸道病例分離菌種之抗原性、毒力因子、菌株親緣性及抗藥性分析

表 1、自 61 例 (8 隻牛和 53 隻羊) 鼻腔拭子和/或肺臟病變進行細菌分離鑑定，每例所分離到之菌種數目及主要菌種所占比例。

Number of isolates <sup>a</sup>	Number of cases(%)	The most commonly seen species(%)
1	35 (57.4)	<i>Pasteurella multocida</i> (45.7) <i>Trueperella pyogenes</i> (17.1) <i>Bibersteinia trehalosi</i> (8.6) <i>Moraxella</i> sp.(8.6)
2	21 (34.4)	<i>Pasteurella multocida</i> and <i>Mannheimia haemolytica</i> (38.1) <i>Pasteurella multocida</i> and <i>Streptococcus</i> sp.(19) <i>Pasteurella multocida</i> and <i>Moraxella</i> sp.(10) <i>Pasteurella multocida</i> and <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (10)
3	4 (6.6)	-- <sup>b</sup>
4	1 (1.6)	--

a. the number of bacterial pathogens isolated from each case.

b. in no particular order.

表 2、比較不同期間(年代)自呼吸道感染病例所分離到之 98 株菌種的分布比例。

Species	2009-2011	2012-2014	2015-2017	Isolates
<i>Pasteurella multocida</i>	3	15	19	37
<i>Mannheimia haemolytica</i>	1	5	12	18
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	0	2	3	5
<i>Moraxella</i> sp.	1	4	5	10
<i>Trueperella pyogenes</i>	3	7	2	12
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1	2	1	4
<i>Actinomyces</i> sp.	0	0	1	1
<i>Nocardia</i> sp.	0	1	0	1
<i>Salmonella</i> sp.	0	1	0	1
<i>Streptococcus</i> sp.	0	3	6	9
Total	9	40	49	98

表 3、所分離到之 37 株 *Pasteurella multocida* 的 MLST 結果。

<i>adk</i>	<i>est</i>	<i>pmi</i>	<i>zwf</i>	<i>mdh</i>	<i>gdh</i>	<i>pgi</i>	ST	serotype	Isolates
21	15	37	74	21	19	29	A	D	21
21	15	37	74	21	19	29	A	A	4
21	15	37	28	20	19	29	B	A	8
21	15	37	28	21	19	29	C	D	1
21	15	17	74	21	19	27	D	D	1
27	11	37	28	20	21	44	E	A	1
26	11	9	10	4	7	8	79	A	1

表 4、所分離到之 18 株 *Mannheimia haemolytica* 的 MLST 結果。

<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>deoD</i>	<i>gapDH</i>	<i>gnd</i>	<i>mdh</i>	<i>zwf</i>	ST	Isolates
2	1	1	2	2	1	2	2	6
1	2	1	2	1	1	1	28	5
1	2	1	2	1	2	1	1	1
1	1	1	2	1	6	1	16	1
9	6	9	9	6	9	10	21	1
12	1	1	2	2	1	1	A	1
2	1	3	3	1	1	4	B	1
9	9	8	8	8	8	12	C	1
13	NF	6	1	8	1	8	D	1

NF=not found in the database.

表 5、藥物敏感性試驗結果（紙錠瓊脂擴散法）。

Antimicrobial agents	No.(%) of resistant isolates			
	<i>Pasteurella multocida</i> (n=37)	<i>Bibersteinia trehalosi</i> (n=5)	<i>Mannheimia haemolytica</i> (n=18)	<i>Moraxella</i> sp. (n=10)
<u><math>\beta</math>-lactam</u>				
Amoxicillin/ clavulanic acid	0 (0)	1(20)	0 (0)	0 (0)
Ceftiofur	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<u>Phenicol</u>				
Florfenicol	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<u>Quinolones</u>				
Enrofloxacin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<u>Aminoglycosides</u>				
Kanamycin	1(2.7)	1(20)	2 (11.1)	0 (0)

註 a: *Mannheimia haemolytica* 及 *Moraxella* sp. 之紙錠瓊脂擴散法抗藥性判讀基準，僅參考 CLSI 之 *Pasteurella multocida* 之判讀基準。



表 6、37 株 *Pasteurella multocida* 最小抑制濃度 (MIC)。

Antimicrobial agents	<i>Pasteurella multocida</i> (n=37)															
	MIC value (µg/mL)										MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	S	I	R	
	0.12 5	0.2 5	0.5 5	1	2	4	8	16	32	64	(µg/ mL)	(µg/mL )	(%)	(%)	(%)	
Ampicillin		20	15	1				1			0.25	0.5	-	-	-	
Ceftiofur		37		1	1						0.25	0.25	100	0	0	
Danofloxacin	36	1									0.125	0.125	100	0	0	
Enrofloxacin	37										0.125	0.125	100	0	0	
Florfenicol		3	31	3	1	1					0.5	0.5	100	0	0	
Gentamicin				1	3	3	2	2			2	4	-	-	-	
Neomycin					0			3	2	3	2		4	16	-	-
Oxytetracycline			11	3	3	1	1				1	1	94.6	2.7	2.7	
Tulathromycin				3	1	5					1	4	100	0	0	
Tiamulin				0	2					3	34		32	32	-	-
Tilmicosin						1	1	6			8	16	-	-	-	
Tylosin						4	7			1	36		32	32	-	-
Trimethoprim/ Sulphamethoxazole				3	7						2	2	0	100	0	
Spectinomycin									21	16	32	64	56.8	43.2	0	

MIC breakpoints are taken from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) except for trimethoprim/sulfamethoxazole (CLSI, 2013). The concentration ranges are marked in white row. MIC values above red line means resistant, and the value which is below the green line means susceptible. A dash indicates no breakpoint defined.

表 7、18 株 *Mannheimia haemolytica* 最小抑制濃度 (MIC)。

Antimicrobial agents	<i>Mannheimia haemolytica</i> (n=18)														
	MIC value (µg/mL)										MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	S	I	R
	0.12 5	0.2 5	0.5 5	1	2	4	8	16	32	64	(µg/ mL)	(µg/mL )	(%)	(%)	(%)
Ampicillin		9	4	1			1	3			0.25	16	-	-	-
Ceftiofur		18									0.25	0.25	100	0	0
Danofloxacin	14	2	1	1							0.125	0.5	100	0	0
Enrofloxacin	16	1			1						0.125	0.25	94.	0	5.6
Florfenicol		1	1	4	1						2	2	100	0	0
Gentamicin				1	3	1	1				4	4	-	-	-
Neomycin						1	8	8	1		8	16	-	-	-
Oxytetracyclin			5	1			1				1	1	94.	0	5.6
Tulathromycin				1	1		1	3			8	16	100	0	0
Tiamulin		1						9	8		16	32	-	-	-
Tilmicosin						2	9	7			8	16	-	-	-
Tylosin					1				17		32	32	-	-	-
Trimethoprim/ Sulphamethoxazole					1						2	2	0	100	0
Spectinomycin									1	17	64	64	5.6	94.	0

MIC breakpoints are taken from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) except for trimethoprim/sulfamethoxazole (CLSI, 2013). The concentration ranges are marked in white row. MIC values above red line means resistant, and the value which is below the green line means susceptible. A dash indicates no breakpoint defined.

## 參考文獻

- 劉世賢、吳永惠、劉炳燦、廖明輝。草食動物傳染性疾病監控：應用酵素結合免疫系統檢測牛羊重要呼吸道傳染病。2004。
- 黃春申。2006~2008 年送檢牛羊病材分離之細菌性病原。行政院農業委員會家畜衛生試驗所學術研討會專訊4：4。2008。
- Quinn PJ MB, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, 2nd ed. Blacjwell Science Ltd. Oxford. 2002.
- Davies RL, MacCorquodale R, Caffrey B. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. Vet Microbiol 91:169-182. 2003.
- El Garch F, de Jong A, Simjee S, Moyaert H, Klein U, Ludwig C, Marion H, Haag-Diergarten S, Richard-Mazet A, Thomas V, Siegwart E. Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009-2012: VetPath results. Vet Microbiol 194:11-22. 2016.
- Francoz D, Buczinski S, Belanger AM, Forte G, Labrecque O, Tremblay D, Wellemans V, Dubuc J. Respiratory pathogens in Quebec dairy calves and their relationship with clinical status, lung consolidation, and average daily gain. J Vet Intern Med 29:381-387. 2015.
- Garcia-Alvarez A, Fernandez-Garayzabal JF, Chaves F, Pinto C, Cid D. Ovine *Mannheimia haemolytica* isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. Vet Microbiol 219:80-86. 2018.
- Hotchkiss EJ, Hodgson JC, Lainson FA, Zadoks RN. Multilocus sequence typing of a global collection of *Pasteurella multocida* isolates from cattle and other host species demonstrates niche association. BMC

- Microbiol 11:115. 2011.
9. Khamesipour F, Momtaz H, Azhdary Mamoreh M. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Front Microbiol* 5:536. 2014.
  10. Klima CL, Zaheer R, Cook SR, Booker CW, Hendrick S, Alexander TW, McAllister TA. Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. *J Clin Microbiol* 52:438-448. 2014.
  11. Kumar J, Dixit SK, Kumar R. Rapid detection of *Mannheimia haemolytica* in lung tissues of sheep and from bacterial culture. *Vet World* 8:1073-1077. 2015.
  12. Lubbers BV, Hanzlicek GA. Antimicrobial multidrug resistance and coresistance patterns of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine respiratory disease cases—a three-year (2009-2011) retrospective analysis. *J Vet Diagn Invest* 25:413-417. 2013.
  13. Noyes NR, Benedict KM, Gow SP, Booker CW, Hannon SJ, McAllister TA, Morley PS. *Mannheimia haemolytica* in feedlot cattle: prevalence of recovery and associations with antimicrobial use, resistance, and health outcomes. *J Vet Intern Med* 29:705-713. 2015.
  14. Portis E, Lindeman C, Johansen L, Stoltman G. A ten-year (2000-2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex—*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni*—in the United States and Canada. *J Vet Diagn Invest* 24:932-944. 2012.
  15. Taylor JD, Holland BP, Step DL, Payton ME, Confer AW. Nasal isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* as predictors of respiratory disease in shipped calves. *Res Vet Sci* 99:41-45. 2015.
  16. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 39:924-929. 2001.
  17. Turni C, Dayao D, Aduriz G, Cortabarria N, Tejero C, Ibabe JC, Singh R, Blackall P. A *Pasteurella multocida* strain affecting nulliparous heifers and calves in different ways. *Vet Microbiol* 195:17-21. 2016.

## **Analysis of Characteristics, Virulence, Phylogenesis, and Antimicrobial Resistance of Respiratory Tract Bacterial Pathogens Isolated from Diseased Cattle and Goats in Taiwan**

NL Kuan\*,C Tu

Animal Health Research institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

**Abstract** Pathogenic bacteria in the ruminant respiratory system usually are considered as opportunists; though bacterial infections sometimes cause severe clinical signs and economic losses. There are only a few studies and investigations about this topic in Taiwan in recent years and the impact of bacterial infections on ruminants may be underestimated. In this study, 98 isolates were recovered from 61 clinical cases from December 2009 to December 2017. Thirty-seven isolates of *Pasteurella multocida*, 18 isolates of *Mannheimia haemolytica*, 10 isolates of *Moraxella* sp. and 5 isolates of *Bibersteinia trehalosi* were included. The main serotype of *Pasteurella multocida* was type D and the secondary was type A. According to MLST analysis, the *Pasteurella multocida* isolates belonged to ST79 and 5 new ST, and *Mannheimia haemolytica* belonged to ST1, ST2, ST16, ST21, ST28, and 4 new ST. Most of the isolates were susceptible to amoxicillin/clavulanic acid, ceftiofur, florfenicol, and enrofloxacin.

**Keywords:** *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, multilocus sequence typing (MLST), antimicrobial resistance